

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Фундаментальной биологии и биотехнологии

Водных и наземных экосистем

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой

подпись инициалы, фамилия
« ____ » _____ 2017 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 Биология

Определение характера взаимодействий психрофильных и
психротолерантных микроорганизмов карстовых пещер и растений

Руководитель _____ профессор, д.б.н.
подпись, дата

Н.А. Гаевский

Выпускник _____
подпись, дата

Ю.А. Коваленко

Красноярск 2017

Оглавление

Введение.....	3
1. Обзор литературы.....	5
1.1. Биологические особенности психрофильных и психротолерантных микроорганизмов.....	5
1.2. Места обитания психрофильных и психротолерантных микроорганизмов.....	8
1.3. Биологическое разнообразие психрофильных и психротолерантных микроорганизмов.....	11
1.4. Карстовые пещеры как среда обитания психрофильных и психротолерантных микроорганизмов	13
1.5. Психрофильные и психротолерантные микроорганизмы в сельскохозяйственной биотехнологии.....	16
2. Материалы и методы исследования	18
3. Результаты и обсуждение.....	Ошибка! Закладка не определена.
Выводы	25
Список использованных источников	26
ПРИЛОЖЕНИЕ А	33
ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	34
ПРИЛОЖЕНИЕ В	35
ПРИЛОЖЕНИЕ Г.....	36

Введение

Психрофильные и психротолерантные бактерии карстовых пещер представляют большой практический интерес для сельскохозяйственной биотехнологии в качестве безопасного биологического средства защиты растений от болезней (Хижняк и др., 2009; Ланкина, 2010; Илиенц, 2011). Эти бактерии функционирующие в составе агроценоза получают дополнительное конкурентное преимущество в начале вегетационного периода над фитопатогенами благодаря пониженному температурному оптимуму для роста (Ланкина, 2010).

Из-за жёстких требований к химической и биологической безопасности психрофильные и психротолерантные микроорганизмы, не способные к росту при температуре человеческого тела, фактически не имеют альтернативы в качестве средства защиты растений в подобных системах (Илиенц, 2011).

Исследования, проведённые в Красноярском государственном аграрном университете, показали, что низкотемпературные карстовые пещеры Средней Сибири являются уникальным природным источником психрофильных и психротолерантных бактерий и грибов (Хижняк и др., 1999, 2001, 2003, Нестеренко, 2007; Хижняк, 2009).

Почвенные микроорганизмы во многих случаях наряду с антагонизмом в отношении патогенов способны стимулировать рост растений (Mausam, Satinder. Brar et.al, 2007). Эта функция у психрофильных и психротолерантных микроорганизмов карстовых пещер до настоящего времени не изучена.

В связи с этим актуальна оценка возможности использования микробных сообществ низкотемпературных пещер, в качестве биопрепарата ускоряющего рост и развитие растений.

Цель работы: исследовать влияние психротолерантных и психрофильных микроорганизмов карстовых пещер на ростовые показатели растений.

Задачи:

Изучить взаимодействие активной культуры психротолерантных и психрофильных штаммов УОЗК2, ВДР5М и ВДР5К на морфологические параметры в вегетационном эксперименте с *Sorghum sudanense* и в лабораторном эксперименте с *Medicago sativa*.

Выпускная квалифицированная работа выполнена на кафедре водных и наземных экосистем в Институте фундаментальной биологии и биотехнологий при сотрудничестве с кафедрой ботаники, физиологии и защиты растений КрасГАУ.

1. Обзор литературы

1.1. Биологические особенности психрофильных и психротолерантных микроорганизмов

Наиболее полный обзор психрофильных и психротолерантных микроорганизмов провела Овсянкина С. В. в работе "Эколого-биологические характеристики бактерий низкотемпературных пещер Сибири, Дальнего Востока и Западного Кавказа" (Овсянкина, 2013). В этой связи данный обзор написан на основании упомянутой диссертации, с небольшими дополнениями.

В зависимости от отношения к той или иной температуре все микроорганизмы делятся на три основные группы: мезофилы, термофилы и психрофилы (Заварзин, Колотилова, 2001; Современная микробиология, 2009; Лысак, 2007; Сахно, Трифонова, 2009; Гусев, Минеева, 2010).

Мезофилы – наиболее распространенная группа микроорганизмов, развивающихся в температурных пределах от +5..+10 до +40..+50°C. Типичным представителем мезофилов является *E. coli*, оптимальная температура роста которой +37°C.

К термофильным относят микроорганизмы, которые растут при температуре выше +45..+50 °C.

Микроорганизмы, способные нормально расти при низких (0..+20°C) температурах, называют психрофильными (Заварзин, Колотилова, 2001; Современная микробиология, 2005; Лысак, 2007; Margesin, Neuner, Storey, 2007; Сахно, Трифонова, 2009; Гусев, Минеева, 2010).

Среди микроорганизмов, способных к росту при низких температурах, выделяют две физиологические группы – облигатные психрофилы и факультативные психрофилы (иногда называемые психротрофами) (Лях, 1976; Квеситадзе, 1990; Заварзин, Колотилова, 2001; Нерусов и др., 2004; Ленгелер, Древис, Шлегель, 2005; Ермилова, 2007; Намсараев и др., 2008). Они различаются по своим экологическим нишам и механизмам адаптации к холоду.

Облигатно психрофильные микроорганизмы растут при температурах ниже +20°C (оптимум ниже +15°C), вплоть до отрицательных значений температур (Громов, Павленко, 1989; Заварзин, Колотилова, 2001; Нерусов и др., 2004; Margesin, Neuner, Storey, 2007; Ермилова, 2007; Намсараев и др., 2008; Современная микробиология, 2009). При этом при низких температурах данные микроорганизмы способны осуществлять полный цикл развития. Так, например, в морских осадках обнаружены психрофильные *Clostridium*, способные образовывать споры при 0°C (Громов, Павленко, 1989). Выделенные из пещер Сибири психрофильные грибы р. *Mucor* в условиях микрокультуры при +4°C проходят полный цикл развития от споры до споры за 4-5 суток, при +10°C – менее чем за 3 суток (Илиенц, 2011).

Важной особенностью «истинных» психрофилов являются низкие температуры в зоне их максимального роста, по сравнению с температурными максимумами у мезофилов. Различные исследователи отмечали исключительную термочувствительность многих морских микроорганизмов, не выдерживающих вполне «умеренных» температур (Лях, 1976). У психрофильных бактерий *Vibrio psychroerythrus* (D'Aoust, Kushner, 1972), *Bacillus psychroerythrus* при повышении температуры нарушалось деление, образовывались нитчатые формы, изменялась структура клеточной стенки и цитоплазматической мембраны, происходила утечка в среду внутриклеточных метаболитов, начинался лизис клеток (Громов, Павленко, 1989).

Разнообразные нарушения морфологии клеток с их последующей гибелью при культивировании при температуре +26°C и выше отмечено для психрофильных бактерий и грибов, выделенных из пещер Средней Сибири (Нестеренко, 2007; Хижняк, 2009; Ланкина, 2010; Илиенц, 2011).

Однако, в ряде случаев невозможно провести чёткую границу между психрофильными, психротрофными (психротолерантными) и мезофильными микроорганизмами. Так, изучение микробных сообществ пещер Средней Сибири (Хижняк и др., 1999, 2001, 2002, 2003; Нестеренко, 2007; Khizhnyak et

al., 2001, 2003, 2008) показало, что, по отношению к температуре пещерные изоляты можно разделить на три группы.

Первую группу составляют облигатно психрофильные формы, не способные к росту при температуре выше $+24..+26^{\circ}\text{C}$. Температурный оптимум развития микроорганизмов данной группы лежит в районе $+15..+20^{\circ}\text{C}$. Это свидетельствует о том, что указанные микроорганизмы являются представителями автохтонной микробиоты пещер, адаптированными к характерным для сибирских пещер низким температурам.

Вторую группу выделяемых в пещерах микроорганизмы составляют мезофильные формы, способные к росту при $+4^{\circ}\text{C}$ с температурным оптимумом выше $+30^{\circ}\text{C}$. Очевидно, данные микроорганизмы представляют собой аллохтонную микрофлору, попадающую в пещеры с поверхности. Тем не менее, их способность к росту при $+4^{\circ}\text{C}$ позволяет существовать в пещерах региона в физиологически активном состоянии и размножаться, внося свой вклад в формирование микробных сообществ карстовых полостей.

Кроме того, достаточно большую группу составляют психротолерантные изоляты, по своему отношению к температуре, занимающие промежуточное положение между облигатно психрофильными и мезофильными формами. Психротолерантные изоляты различаются между собой по конкретным температурным оптимумам, что позволяет рассматривать как эволюционно переходные формы от мезофильных к психрофильным организмам (Нестеренко, 2007; Хижняк, 2009).

В связи с отсутствием ярко выраженных границ между психрофильными и психротрофными (психротолерантными) микроорганизмами в современной зарубежной литературе обе эти группы часто объединяют термином "cold adapted" ("адаптированные к холоду") (Sánchez, Gómez, Delgado, 2009).

Главной специфической чертой психрофильных организмов является их способность расти со значительно большими скоростями, чем мезофилы, при температурах ниже $+10^{\circ}\text{C}$. При этом облигатные психрофилы имеют более высокий темп размножения, чем факультативные (Лях, 1976). Наиболее

заметно различие между мезофилами и психрофилами при температурах 0..+10°C, когда несбалансированность метаболизма, вызванная низкими температурами, может полностью подавлять функцию клеточного деления у мезофиллов (Jackson, 1974).

Психрофильные микроорганизмы адаптированы к низкой температуре благодаря высокому содержанию в липидах мембран полиненасыщенных жирных кислот, обеспечивающих достаточную текучесть и транспортную активность мембран при низкой температуре (Воробьева, 2004; Ермилова, 2007; Современная микробиология, 2009; Rodrigues, Tiedje, 2008), а также синтезу криопротекторов (например, глицерола). За счет веществ, препятствующих образованию кристаллов льда, микроорганизмы способны переживать замораживание (Воробьева, 2004; Ермилова, 2007; Современная микробиология, 2009). Исследования микробных сообществ Байкала показали, что при воздействии замораживания-оттаивания сохраняется активность и выживаемость микроорганизмов (Максимов и др., 2006).

1.2. Места обитания психрофильных и психротолерантных микроорганизмов

Психрофильные микроорганизмы, особенно те из них, которые растут в очень узком температурном интервале, бесспорно, эволюционно сформировались в условиях постоянно низких температур, поскольку все изученные на сегодняшний момент психрофилы (за исключением некоторых спорообразующих) погибают при температурах, характерных для мезофильных местообитаний (Жизнь микроорганизмов в экстремальных условиях, 1981).

Природные экологические ниши психрофилов многочисленны и многообразны. Психрофилы формируют постоянную микрофлору регионов вечного холода, полярных регионов и океанов, которые занимают 14 и 71% поверхности Земли соответственно. Около $\frac{3}{4}$ поверхности Земли покрыто водами морей и океанов, 90% общего объема воды в них имеет температуру ниже +5°C (от -1,5 до +4,5°C). Дно океанов холоднее +3°C. Почвы в высоких

широтах даже в летнее время охлаждены (ниже $+10^{\circ}\text{C}$), в средних широтах их температуры не превышают, как правило $+20^{\circ}\text{C}$, снижаясь в холодное время года до 0°C и ниже (Жизнь микроорганизмов в экстремальных условиях, 1981; Громов, Павленко, 1989). Температура пещер умеренной климатической зоны держится на уровне $+2..+7^{\circ}\text{C}$ (Щеглов, Колясников, 1964; Цыкин, 1974; Хижняк, 2009). Эти данные дают представление о размерах психро- и криосфер.

Согласно данным литературы, большое количество психрофильных микроорганизмов выделено из различных объектов Антарктики и горных ледников, тундровых почв Арктики (Жизнь микроорганизмов в экстремальных условиях, 1981; Громов, Павленко, 1989; Ganzert et al., 2011), из почвы на Аляске (Nam, Ahn, 2011). В лесных криогенных почвах севера Средней Сибири выявлено преимущественное развитие комплексов психротолерантных бактерий и микромицетов (Сорокин и др., 2008).

Психрофильные бактерии обнаружены также в высокогорье – в альпийских почвах и в ледниках (Zhang et al., 2010; Xu, Xin, Tian, 2011).

Важным местообитанием психрофильных микроорганизмов являются низкотемпературные водоёмы. Так, из проб воды пелагиали Южной, Средней и Северной котловин озера Байкал, отобранных в разные сезоны 2002 г., с глубин от поверхности до 1400 м выделено свыше 1000 штаммов психрофильных микроорганизмов. Отмечено, что бактерии данной группы встречались по всей акватории озера и выделялись из всей толщи воды. По морфологии около 70% бактерий представлено палочковидными и 10% кокковидными формами (Намсараев и др., 2008). Исследования Никулиной И.Г., Парфеновой В.В. (2007) показали, что температурный оптимум роста большинства байкальских бактерий находится в области $+18..+22^{\circ}\text{C}$.

Океаны также являются естественной средой обитания психрофильных и психротрофных (психротолерантных) бактерий (Жизнь микроорганизмов в экстремальных условиях, 1981; Громов, Павленко, 1989; Современная микробиология, 2009). Большинство бактерий, найденных в морской воде и

осадках в ассоциации с растениями или животными, оказались психротрофными. Встречаются также и психрофильные бактерии, но в значительно меньшем количестве (Жизнь микроорганизмов в экстремальных условиях, 1981). Первое подробное описание психротрофных морских бактерий и их температурных характеристик составил Морита (Morita, 1966, 1975).

Среди психрофильных бактерий встречаются формы, ассоциированные с высшими организмами. Так, психрофильные представители р. *Vibrio* неоднократно выделяли из кишечника морских рыб и беспозвоночных. Ещё в конце 70-х – начале 80-х годов 20 века было показано, что эти бактерии осуществляют разложение хитина *in situ* в кишечнике морских животных при переваривании хитиновых панцирей ракообразных (Жизнь микроорганизмов в экстремальных условиях, 1981; Громов, Павленко, 1989).

Из почв умеренного климата были выделены бактерии, грибы и дрожжи, способные расти при температуре 0°C и ниже. Психротрофные бактерии, способные расти ниже +5°C, широко распространены в почвах. Большая часть общей микрофлоры ризосферы, а также почв болот, пастбищ и засоленных пустошей оказалась психротрофной. Наименьшее количество психротрофов было обнаружено в культивируемых почвах, а наибольшее в почвах под садами (Druce, Thomas, 1970). В тундре обнаружено метанотрофное психрофильное сообщество бактерий (Берестовская и др., 2002).

Изучение микробиоты пещер Средней Сибири (Хижняк и др., 1999, 2001, 2002, 2003, 2009; Нестеренко, 2007; Khizhnyak et al., 2001, 2003, 2008) показало, что в пещерах региона присутствуют естественные микробные сообщества, представленные психрофильными и психротолерантными бактериями и грибами, способные к росту в интервале температур +3...+20°C и +3...+28°C соответственно. При этом общая численность бактерий и грибов в пещерах во многих случаях соответствует численности бактерий и грибов в наземных экосистемах региона или даже превосходит её. Авторами также отмечено, что численность типично мезофильных микроорганизмов в пещерах во много раз уступает численности психрофильных и психротолерантных форм (Овсянкина,

2013).

Психротолеранты более широко распространены, чем облигатные психрофилы. При температуре 0°C облигатные психрофилы растут быстрее, что в конечном счете и обеспечивает их доминирование в местах обитания с постоянно низкими значениями температуры. В условиях умеренного климата весной, когда температура поднимается до +25..+30°C, она становится мощным селективным фактором, благоприятным для психротолерантов и исключаящим облигатные формы (Громов, Павленко, 1989).

В регионах с постоянно низкими температурами психрофильные бактерии играют существенную роль в превращении веществ. В таких условиях деятельность мезофильной микрофлоры полностью блокирована низкими температурами, однако благодаря психрофилам круговорот веществ не прерывается (Лях, 1976).

1.3. Биологическое разнообразие психрофильных и психротолерантных микроорганизмов

Психрофилы не образуют единой, или хотя бы нескольких филогенетических групп (Лях, 1976; Громов, Павленко, 1989; Нерусов и др., 2004). Из выделенных и охарактеризованных таксономических групп психрофильных микроорганизмов подавляющее большинство составляют бактерии (Morita, 1975; Russell, 1998). Среди них есть палочки, кокки, вибрионы, грамотрицательные и грамположительные, образующие споры и не образующие их, строгие аэробы, факультативные и строгие анаэробы (Громов, Павленко, 1989; Квеситадзе, 1990).

Психрофильные формы обнаружены среди представителей родов *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Alteromonas*, *Arthobacter*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Nitrobacter*, *Nitrozomonas*, *Micrococcus*, *Myxococcus*, *Sorangium*, *Proteus*, *Psychrobacter*, *Psychromonas*, *Streptococcus*, *Flavobacterium*, *Janthinobacterium* и др. (Жизнь микроорганизмов в экстремальных условиях, 1981; Громов, Павленко, 1989;

Квеситадзе, 1990; Онищенко, Киприанова, Ярошенко, 2008; Намсараев и др., 2008; Zhang et.al. 2010; Xu, Xin, Tian, 2011).

Психротрофы описаны среди представителей родов *Bacillus*, *Micrococcus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Chromobacter*, *Caulobacter*, *Acinetobacter*, *Arthobacter* и др. (Druce, Thomas, 1970; Берестовская и др., 2006; Ермилова, 2007).

Психрофильные штаммы дрожжей обнаружены у родов *Candida*, *Cryptococcus*, *Bullera*, *Rhodotorula*, *Sterigmatosporidium*, *Sporobolomyces*, *Aureobasidium*. Психрофильными формами является большинство видов *Leucosporidium* – гетеробазидиальной стадии некоторых дрожжей рода *Candida* (Лях, 1976; Квеситадзе, 1990; Качалкин, 2011). Среди психрофильных дрожжей встречаются и эпифитные формы. Так, с поверхности сфагновых мхов и болотных сосудистых растений Московской области выделено несколько редких видов и разновидностей психрофильных дрожжевых грибов. По нуклеотидным последовательностям региона D1/D2 26S рДНК они были отнесены к видам: *Sterigmatosporidium polymorphum*, *Rhodotorula psychrophena* и *Aureobasidium pullulans* var. *subglaciale* (Качалкин, 2011).

Психрофильные формы у мицелиальных грибов обнаружены среди представителей родов *Aureobasidium*, *Dematium*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Chrysosporium*, *Alternaria*, *Stemphylium*, *Hormodendron*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Pibicillium* (Квеситадзе, 1990; Margesin, 2007; Нестеренко, 2007; Илиенц, 2011).

В 70-е годы 20 века были также обнаружены фаги психрофильных бактерий, которые в большинстве случаев сами проявляют психрофильные свойства. Обнаружены фаги, специфичные для грамотрицательных бактерий, особенно для видов *Pseudomonas* и некоторых морских бактерий, так и для грамположительных (например, *Micrococcus cryophilus*) (Лях, 1976). Фаг C1, избирательно поражающий *Micrococcus cryophilus*, исключительно чувствителен к нагреванию и инактивируется на 70% при +40°C за 5 мин и на 99,9% – при +45°C (Kulpa, Olsen, 1971).

В ряде случаев психрофильные микроорганизмы обнаруживаются даже в субтропических широтах. Так, из вод Черного моря были выделены

представители родов *Alteromonas* и *Psychrobacter*, идентичные населяющим Антарктиду экстремофильным видам (Онищенко, Киприанова, Ярошенко, 2008). Из вод Южного моря (Корея) выделены психрофильные виды *Psychrobacter celer*, *Ps. aquimaris* (Овсянкина, 2013).

Среди фототрофных микроорганизмов встречаются психрофилы, способные развиваться на поверхности снега или льда. Наиболее распространена одноклеточная водоросль *Chlamydomonas nivalis*, в результате развития которой поверхность снега окрашивается в розовый цвет (Нерусов, Бонч-Осмоловская, Горленко и др., 2004; Современная микробиология, 2009).

1.4. Карстовые пещеры как среда обитания психрофильных и психротолерантных микроорганизмов

В современной научной литературе отсутствует единое определение понятия пещеры. Согласно В.Н. Дублянскому и В.Н. Андрейчуку (Дублянский, 1991) существуют различные определения пещеры, вот некоторые из них:

1. Подземное пространство, образованное в легко растворимой породе в результате деятельности подземных вод (Барков, 1954).
2. Полость в верхней части земной коры, сообщающаяся с поверхностью одним или несколькими входными отверстиями (Маурашвили, 1969; Щукин, 1980).
3. Горизонтальный канал (Зайцев, 1940).
4. Естественная полость, доступная для проникновения человека (ТСАГТ; SF), имеющая не освещенные солнечным светом части (Цыкин, 1985), имеющая длину (глубину) больше, чем два других измерения (Ляхницкий, 1987).

Среди пещер различного типа наибольшее распространение на нашей планете имеют карстовые пещеры, образующиеся в результате растворения и механического разрушения проницаемых растворимых (карстующихся) горных пород. Одновременно с разрушением может происходить процесс переотложения вещества, часто в виде новых минералов (например –

сингенетическое карсту рудообразование). К карстующимся породам относятся карбонатные, сульфатные и соляные (Дублянский, 2000).

Общее число карстовых пещер на нашей планете и их суммарная протяжённость на сегодняшний момент неизвестны даже приблизительно. По состоянию на 2006 г. было известно о 1628 крупных (протяжённостью более 3000 м) карстовых пещерах с суммарной протяженностью ходов около 17,4 тыс. км (World Cave Database, 2006). Однако открытие новых крупных пещер происходит ежегодно, в том числе в районах, считавшихся хорошо изученными в спелеологическом отношении, поэтому справочная информация относительно числа обследованных пещер устаревает ещё до её опубликования. По оценкам карстологов, на сегодняшний момент известно не более 1% реально существующих карстовых пещер. В целом, масштабы распространения и размеры карстовых пещер таковы, что позволяют выделять их в особую оболочку Земли – карстосферу (Маруашвили, 1970).

Пещеры характеризуются целым комплексом присущих только им физико-химических особенностей: отсутствие света, постоянная пониженная температура, высокая влажность, низкое содержание органического вещества, изолированность от внешнего мира и труднодоступность. Важнейшими физическими условиями, определяющими формирование и функционирование подземных экосистем, являются освещенность, температура и водный режим карстовой полости (Хижняк, 2009).

Исследования под руководством д.б.н. Хижняка С.В. впервые показали присутствие естественных микробных сообществ в холодных карстовых пещерах Сибир. Было показано, что эти сообщества включают в себя психрофильные и психротолерантные микроорганизмы, отсутствующие в наземных экосистемах (Овсянкина, 2013).

Из микробных сообществ сибирских пещер выделены психрофильные и психротолерантные формы среди представителей четырёх отделов микромицетов (Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota, Deuteromycota)

(Хижняк и др., 2001, 2002, 2003, 2009; Нестеренко, 2007; Khizhnyak et al., 2001, 2003, 2008; Илиенц, 2011).

Выделенные из пещер Красноярского края психрофильные и психротолерантные микромицеты представлены главным образом родов *Chrysosporium* и *Mucor*, обнаружены также представители родов *Penicillium*, *Raecilomyces*, *Verticillium*, *Doratomyces*. В пещере Сарма (Кавказ) присутствуют адаптированные к низким температурам микромицеты, среди которых выявлены представители родов *Mucor*, *Penicillium*, *Fusarium* (Илиенц, Хижняк, 2011, Овсянкина, 2013).

Адаптация микромицетов к условиям пещер проявляется в существенно более короткой, чем у мезофильных почвенных грибов, лаг-фазе при прорастании спор при температуре пещер (15-20 часов против более чем 100 часов у мезофильных изолятов при +4...+6°C); более высокой, чем у мезофильных изолятов, максимальной удельной скорости роста в диапазоне температур от +4...+6°C до +17°C; более высокой скорости образования новых точек роста в диапазоне температур от +4...+6°C до +21°C; неспособности к прорастанию и росту при температурах выше +26..+28°C (Илиенц, Хижняк, 2011, Овсянкина, 2013).

Среди обитающих в пещерах психрофильных и психротолерантных бактерий идентифицированы представители родов *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Pseudochrobactrum*, *Paenibacillus*, *Sporosarcina* и коринебактерии. Максимальная температура роста выделенных бактерий варьирует от +23 до +30°C (Ланкина, Хижняк, 2010).

Было также показано, что микробные сообщества карстовых пещер умеренной климатической зоны являются природным источником перспективных для использования в биотехнологии психрофильных и психротолерантных штаммов микроорганизмов (Хижняк, 1999, 2001, 2002, 2003, 2009, 2011; Нестеренко, 2007, Ланкина, 2010, Илиенц, 2011).

Психрофильные и психротолерантные бактерии и грибы на территории Российской Федерации обнаружены также в пещерах Урала. Так, в результате

изучения микробиоты пещеры Киндерлинская (Южный Урал), установлено, что коэффициент психротолерантности, представляющий собой отношение числа колоний микроорганизмов, выросших при +10°C к числу колоний, выросших при +28°C, в разных участках пещеры составляет от 2 до 35. При этом в точках, тесно связанных с поверхностью, преобладали мезофильные формы, а по мере углубления в пещеру доля выделяемых психротолерантных форм в составе комплекса возрастала (Кузьмина и др., 2012).

1.5. Психрофильные и психротолерантные микроорганизмы в сельскохозяйственной биотехнологии

В связи с отсутствием собственной продукции органического вещества в сибирских пещерах, в микробных сообществах наблюдается существенно более жёсткая, чем в почвах, конкуренция за питательный субстрат, количество и разнообразие которого в пещерах значительно ниже, чем в наземных экосистемах. В этой связи для пещерных микроорганизмов характерна способность к образованию антибиотических веществ, дающая важное конкурентное преимущество в условиях жёсткого субстратного лимитирования.

В сочетании с неспособностью пещерных микроорганизмов к росту при температуре человеческого тела и их способностью к росту при низких температурах, характерных для начала вегетационного периода, это открывает перспективы использования штаммов пещерных микробных сообществ для биологической борьбы с болезнями сельскохозяйственных растений (Ланкина, 2010).

Полевые испытания, проведенные в 2008 г., показали высокую эффективность штаммов пещерных бактерий в защите зерновых от корневых гнилей. Эффект бактеризации проявился в статистически значимом ($p < 0,001$) снижении поражения ячменя и пшеницы корневой гнилью в стадиях всходов, колошения и кущения. Наиболее эффективно проявил себя штамм ВДР5.

Полевые испытания 2008 г. показали также высокую эффективность пещерных изолятов в обеспечении статистически значимой ($p < 0,05$) прибавки урожая, которая не уступала некоторым химическим фунгицидам. По сравнению с контролем наиболее эффективно проявил себя тот же штамм ВДР5 (Ланкина, Хижняк, 2012).

Таким образом, почвенные психрофильные и психротолерантные микроорганизмы наряду с антагонизмом в отношении патогенов способны стимулировать рост растений. Способность психрофильных и психротолерантных микроорганизмов карстовых пещер влиять на рост и развитие растений до настоящего времени не изучена.

В связи с этим актуальна оценка возможности использования микробных сообществ низкотемпературных пещер, в качестве биопрепарата ускоряющего рост и развитие растений.

2. Материалы и методы исследования

Объектами исследования служили штаммы микроорганизмов УОЗК2, ВДР5К и ВДР5М выделенные из микробных сообществ карстовых известняковых пещер «Водораздельная» и «Женевская» находящихся на территории Красноярского края (рис. 1).



Рисунок 1 – Расположение пещер «Женевская» и «Водораздельная» в Красноярском крае

Описание пещер по Базе знаний спелеологии (<http://www.krasspeleo.ru/doku.php>).

Пещера Водораздельная (Садовая), кадастровый номер В3а-3, открыта в 2007 году.

Карстово-спелеологический участок: Торгашинский спелеоучасток

Карстовый район: Приенисейская складчато-блоковая зона

Горный массив (плато): Восточно-Саянская область

Административное положение: Красноярский край, Березовский район.

Морфометрические характеристики: Протяженность ходов ок. 2500 м, глубина 177 м.

Пещера Женевская, кадастровый номер В3в-58, открыта в 2006 году.

Карстово-спелеологический участок: Бирюсинский спелеоучасток

Карстовый район: Приенисейская складчато-блоковая зона

Горный массив (плато): Восточно-Саянская область

Административное положение: Красноярский край, Емельяновский район.

Морфометрические характеристики: Протяженность ходов 6020 м, глубина 60 м, амплитуда 90 м.

Культуры бактерий были выращены на ГРМ-агаре и предоставлены профессором, д.б.н. Сергеем Витальевичем Хижняком.

Состав ГРМ-агара, г/л: панкреатический гидролизат рыбной муки - 24,0, натрий хлорид - 4,0 и агар - $12,0 \pm 2,0$.

Для эксперимента были взяты 3 штамма бактерий: УОЗК2, ВДР5К и ВДР5М.

ВДР5М – найден в пещере Водораздельная.

Морфологические особенности штамма: короткие прямые или слегка изогнутые палочки неправильной формы. Клетки одиночные или в парах (рис.2).

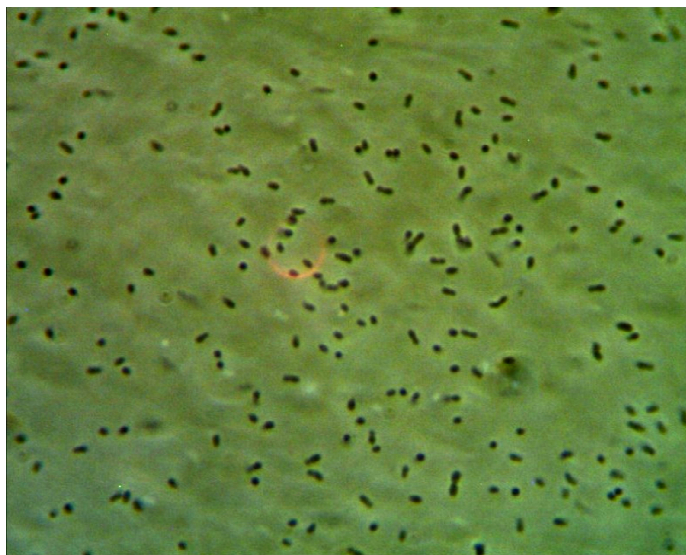


Рисунок 2 – Морфология клеток изолята ВДР5М, 60-часовая культура, объектив x100, фазовый контраст, масляная иммерсия, ГРМ-агар (фото автора)

Растёт в диапазоне $+4^{\circ}\text{C} \dots +22^{\circ}\text{C}$, предельная температура роста составляет $+23^{\circ}\text{C}$. Это позволяет отнести изолят к психрофильным бактериям, представляющим автохтонную микробиоту пещеры (Ланкина, Хижняк, 2012).

ВДР5кр - найден в пещере Водораздельная.

Морфологические особенности: относительно крупные спорообразующие палочки, прямые и слабо изогнутые; одиночные и в парах; спора – овальная, терминальная или субтерминальная; диаметр споры, как правило, не превышает ширины клетки.

Хорошо растёт в диапазоне температур от $+4$ до $+29^{\circ}\text{C}$, при температуре $+29^{\circ}\text{C}$ возможно образование аномально вздутых неспорулирующих клеток (рис. 3). Максимальная температура роста $+29.. +30^{\circ}\text{C}$.

Это позволяет отнести изолят к психротолерантным представителям автохтонной микробиоты пещеры (Ланкина, Хижняк, 2012).

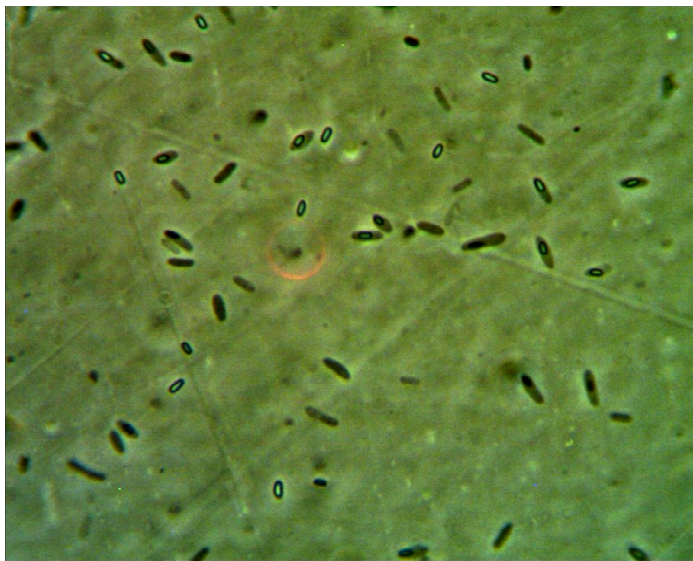


Рисунок 3 – Морфология клеток штамма ВДР5кр, вегетативные клетки, клетки со спорами (60-часовая культура) - объектив $\times 100$, фазовый контраст, масляная иммерсия (фото автора)

УОЗК2 - найден в пещере Женевская.

Морфологические особенности штамма: относительно крупные спорообразующие палочки, прямые и слабо изогнутые; одиночные или в парах;

спора – круглая, терминальная или субтерминальная; диаметр споры, как правило, не превышает диаметра клетки (рис. 4).

Изолят растёт в диапазоне температур от +4 до +26°C (верхний температурный предел роста), что позволяет отнести его к психротолерантным, близким к психрофильным, представителям аллохтонной микробиоты пещеры (Ланкина, Хижняк, 2012).

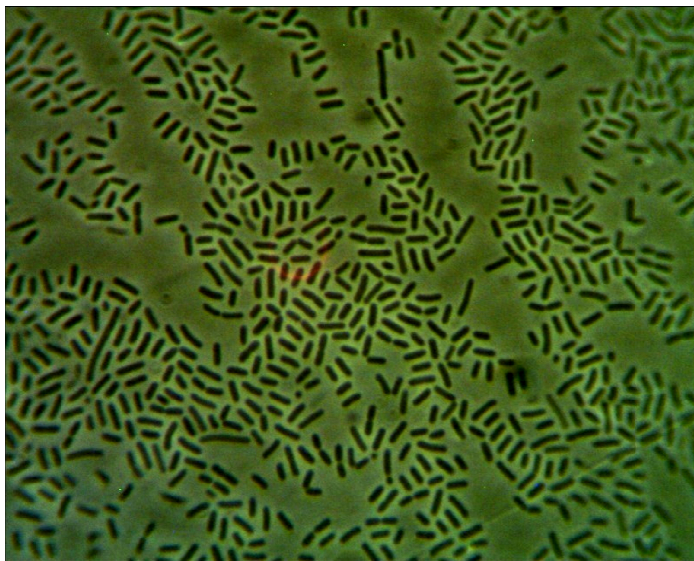


Рисунок 4 – Морфология клеток штамма УОЗК2 (вегетативные клетки), 60-часовая культура на ГРМ-агаре, объектив x100, фазовый контраст, масляная иммерсия (фото автора)

В качестве объекта для вегетационного эксперимента использовали *Sorghum sudanense*.

Суданская трава, или сорго суданское (лат. *Sorghum sudanense*) — однолетнее травянистое растение, разновидность сорго — культуры семейства Злаки, или Мятликовые (Poaceae), класса Однодольные (Monocotyledones) (Соловьев, 1975). Сорго растение с С4-тип метаболизма.

Суданская трава имеет мощно развитую мочковатую корневую систему, уходящую на глубину до 2,5 м. Стебель цилиндрический, заполнен губчатой паренхимой. Высота растения — 80—300 см. Раннеспелые сорта имеют 3—5 междоузлий на стебле, позднеспелые— 8—12. По общей кустистости

различают три группы: слабокустистая, с числом побегов на кусте не более 12, среднекустистая — с числом побегов 12—25 и сильнокустистая — с числом побегов более 25. По форме куста сорта суданской травы разделяют на прямостоячие, слабо раскидистые, раскидистые, полулежачие и лежачие. Наибольшее распространение получили сорта с прямостоячим и слабо раскидистым кустом (Веско, 2006).

Лабораторную оценку эффективности штаммов проводили методами предварительно бактеризованных семян Суранской травы с последующим выращиванием в сосудах с землей и вермикулитом в течение 14 суток. Были отобранные 200 шт. семян. Для смыва использовали водопроводную воду. Внесли в чашку 5 мл воды, растерли шпателем, перелили всё в стаканчик. Добавили ещё 10 мл воды, перелить из стаканчика в пробирку, заткнули пробкой, сильно встряхивали до получения однородной суспензии. Общий объем смыва клеток 15 мл. 2 мл суспензии использовались для титра. В 13 мл суспензии поместили 50 сухих зерен. Суспензию с семенами поместили в холодильник на 60 минут. Каждые 15 минут семена с суспензией взбалтывались. Спустя 60 минут в стерильные чашки Петри с фильтровальной бумагой добавили по 5 мл воды и выложили по 50 семян без промывки. По 3,5 мл суспензии внесли в почвенную культуру. В течение 2 суток семена прорастивались. Через 2 суток была определена энергия прорастания. Проросшие семена были выложены в почву. Выращивали в сосудах на 150 мл с землей и вермикулитом. Влажность поддерживали на уровне 85%. Температура +26°C...+28°C. Полив производился водой.

Контролем служили растения, семена которых не подвергались обработке споровой суспензией. В ходе эксперимента определяли динамику роста проростков, через 14 суток — длину надземной и подземной части растений, распространённость и интенсивность развития, сухую массу надземной и подземной части растений, общую массу растений.

В качестве объекта для лабораторного эксперимента использовали *Medicago sativa*.

Люцерна посевная (лат. *Medicago sativa*) — травянистое растение; типовой вид рода Люцерна (*Medicago*) семейства Бобовые (*Fabaceae*) (Флора СССР, 1945). Растение с СЗ типом метаболизма. Люцерна – многолетнее холодостойкое растение, хорошо разрыхляет плотную почву, улучшает ее структуру, повышает плодородие, обогащает азотом, снижает кислотность. Мощная, глубоко расположенная корневая система повышает воздухо- и водонепроницаемость почвы, способствует накоплению гумуса. Люцерна используется как фитосанитарная культура, так как устойчива к заболеваниям.

Качество семян соответствует ГОСТ Р 52325-2005. Производитель ООО ПКФ «Семена для Сибири».

Лабораторную оценку эффективности штаммов проводили методами предварительно бактеризованных семян люцерны с последующим проращиванием в чашках Петри в течение 7 суток.

Были отобраны 300 шт. семян. Семена отбирали без видимых повреждений. 12 чашек Петри с фильтровальной бумагой ставили в термостат при +100°С на 1 час стерилизоваться. В первом эксперименте жидкую культуру бактерий не разбавляли. Во втором эксперименте жидкую культуру бактерий разбавляли 1:100 дистиллированной водой. В стерильные чашки Петри добавляли по 2 мл бактериального раствора и выкладывали по 25 семян. Через 5 суток в чашки Петри добавляли 2 мл отстоянной воды и ставили еще на 2 суток проращиваться. На 7 сутки определяли лабораторную всхожесть. Температура + 20°С. Освещение искусственное, непрерывное, интенсивность 1,1 килолюкс.

Контролем служили растения, семена которых не подвергались обработке бактериальной культурой. В ходе эксперимента определяли энергию прорастания, длину подземной части растений.

Математическую обработку результатов исследований проводили методом описательной статистики (Плохинский, 1970). В качестве программного обеспечения использовали MS Office XP и StatSoft STATISTICA 6.0.

На основе цифровых снимков в программе ImageJ измеряли длину корней и стеблей (рис.5). Программа позволяет измерять линейные размеры с точностью 0,01см. Интенсивность освещения измеряли Digital Light Meter 5202 фирмы Kyoritsu.



Рисунок 5 – проростки *Medicago sativa* опытного варианта (фото автора)

Достоверность различий средних значений определяли по t-критерию Стьюдента.

Выводы

1. Среди исследуемой активной культуры психротолерантных и психрофильных штаммов УОЗК2, ВДР5М и ВДР5К оказывали губительное влияние на морфологические показатели растений. В большинстве случаев влияние бактеризации семян штаммами было или отрицательное, или положительное.
2. В отношении С4-растений влияние психротолерантных и психрофильных штаммов проявлялось только на начальных стадиях и выражалось в подавлении роста корня и роста стеблей у штаммов ВДР5М. Влияние культуры на содержание каротиноиды, хлорофилл а и b выражалось в одновременном увеличении их концентрации, но без изменения их соотношений.
3. Не разведенная культура всех штаммов оказалась губительна на проростки семян *Medicago sativa*. Разведение 1:100 не вызывает достоверных изменений в развитии корневой системы и энергии прорастания.
4. Проведенные исследования не позволяют выявить значительного влияния штаммов на ростовые и физиологические процессы растений.

Список использованных источников

1. База знаний спелеологии [Электронный ресурс]. – 2011. <http://www.krasspeleo.ru>.
2. Берестовская, Ю.Ю. Метанотрофы психрофильного микробного сообщества заполярной тундры России / Ю.Ю. Берестовская, Л.В. Васильева, О.В. Честных и др. // Микробиология. – 2002. – Том 71. – №4. – С. 538–544.
3. Берестовская, Ю.Ю. Психротолерантный *Caulobacter* из почвы заполярной тундры России / Ю.Ю. Берестовская, А.М. Лысенко, Т.П. Турова и др. // Микробиология. – 2006. – Том 75. – №3. – С. 377–382.
4. Васильченко, И. Т. Род Люцерна – *Medicago* L. / И. Т. Васильченко // Флора европейской части СССР. Т. 6. – Л. : Наука, 1987. – С. 187.
5. Воробьева, Л.И. Стрессоры, стрессы и выживаемость бактерий (обзор) / Л.И. Воробьева // Микробиология. – 2004. – Том 40. – №3. – С. 261–269.
6. Громов, Б.В. Экология бактерий / Б.В. Громов, Г.В. Павленко. – Л.: Изд-во ленинградского университета, 1989. – 248 с.
7. Гусев, М.В. Микробиология / М.В. Гусев, Л.А. Минеева. – М.: Академия, 2010. – 464 с.
8. Дублянский, В.Н. Терминология спелеологии./ В.Н. Дублянский, В.Н. Андрейчук. – Кунгур: УрО АН СССР, 1991. - 202 с.
9. Дублянский, В.Н. Занимательная спелеология / В.Н. Дублянский - Челябинск: Урал, 2000 - 527 с.
10. Егорова, Н.С. Руководство к практическим занятиям по микробиологии / Н.С. Егорова. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1995. – 224 с.
11. Ермилова, Е.В. Молекулярные аспекты адаптации прокариот / Е.В. Ермилова. – СПб.: Изд-во Санкт-Петерб. ун-та, 2007. – С. 172–179.
12. Жизнь микроорганизмов в экстремальных условиях / под ред. Д. Кашнера. – М.: Мир, 1981. – 519 с.

13. Заварзин, Г.А. Введение в природоведческую микробиологию: учеб. пособие / Г.А. Заварзин, Н.Н. Колотилова. – М.: Книжный дом «Университет», 2001. – 256 с.
14. Илиенц, И.Р. Сообщества микромицетов пещер как источник штаммов для сельскохозяйственной и экологической биотехнологии: автореферат диссертации на соискание ученой степени канд. биол. наук: 03.02.08 / И.Р. Илиенц. – Красноярск, 2011. – 19 с.
15. Качалкин, А.В. Новые данные о распространении некоторых психрофильных дрожжевых грибов Московской области / А.В. Качалкин // Микробиология. – 2011. – Том.79. – №6. – С. 843–847.
16. Квеситадзе, Г.И. Ферменты микроорганизмов живущих в экстремальных условиях / Г.И. Квеситадзе. – М.: Наука, 1990. – 54 с.
17. Кузьмина, Л.Ю. Микробиота пещеры Киндерлинская (Южный Урал, Россия) / Л.Ю. Кузьмина, Н.Ф. Галимзянова, Ш.Р. Абдуллин и др. // Микробиология. – 2012. – Т. 81. – № 2. – С. 273–281.
18. Ланкина, Е.П. Бактериальные сообщества пещер как источник штаммов для биологической защиты растений от болезней: автореферат диссертации на соискание ученой степени канд. биол. наук: 03.02.08 / Е.П. Ланкина. – Красноярск, 2010. – 18 с.
19. Ланкина, Е.П. Бактериальные сообщества пещер как источник штаммов для биологической защиты растений от болезней / Е.П. Ланкина, С.В. Хижняк. - Красноярск: Изд-во Краснояр. гос. аграр. ун-та, 2012. – 91-93, 125 с.
20. Ленгелер, Й. Современная микробиология: прокариоты: в 2 т.; пер. с англ. / Й. Ленгелер, Г. Древис, Г.Шлегель. – М.: Мир, 2005. – 695 с.
21. Лысак, В.В. Микробиология / В.В. Лысак. – Минск: БГУ, 2007. – 426 с.
22. Лях, С.П. Адаптации микроорганизмов к низким температурам./ С. П. Лях– М.: Наука, 1976.– 158с.

23. Максимов, В.В. Реакция микробных сообществ Байкала на воздействие экстремальных температур / В.В. Максимов, Е.В. Щетинина, О.В. Крайковская и др. // Микробиология. – 2006. – Т.75. – №6. – С. 752–757.
24. Намсараев, Б.Б. Экология микроорганизмов экстремальных водных экосистем / Б.Б. Намсараев, Е.Ю. Абидуева, Е.В. Лаврентьева и др. – Улан-Уде: Изд-во БГУ, 2008. – 94 с.
25. Нестеренко, Е. В. Микробиоты карстовых полостей Средней Сибири: автореферат диссертации на соискание ученой степени канд. биол. наук: 3.00.16 / Е. В. Нестеренко. – Красноярск, 2007. – 19 с.
26. Плохинский Н.А. Биометрия./ Н.А. Плохинский. - М.: Изд-во МГУ, 1970. – 360 с.
27. Образовательный математический сайт [Электронный ресурс]. <http://old.exponenta.ru>.
28. Овсянкина С.В. Эколого-биологические характеристики бактерий низкотемпературных пещер Сибири, Дальнего Востока и Западного Кавказа: автореферат диссертации на соискание ученой степени канд. биол. наук: 03.02.08 / С.В. Овсянкина. – Красноярск, 2013. – 7-25 с.
29. Онищенко, О.М. Психрофильные бактерии родов *Alteromonas* и *Psychrobacter*, выделенных из воды Черного моря // О.М. Онищенко, Е.А. Киприанова, Л.В. Ярошенко // Морской экологический журнал. – 2008.– Т. VII. – №1. – С. 56–59.
30. Сахно, О.Н. Экология микроорганизмов / О.Н. Сахно, Т.А. Трифонова. – Владимир: Владимирской государственной университет, 2009. – 52 с.
31. Современная микробиология / под ред. И. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля и др. – М.: Мир, 2009. – Т.1. – 656 с.
32. Соловьев Б. Ф. Суданская трава — высокопродуктивная кормовая культура / Б. Ф. Соловьев. – М.: Колос, 1975. – 112 с.
33. Сорокин, Н.Д. Экологические особенности развития микрофлоры в лесных криогенных почвах севера средней Сибири / Н.Д. Сорокин, С.Ю.

Евграфова, И.Д. Гродницкая и др. // Сибирский экологический журнал. – 2008. – №6. – С. 859–865.

34. Флора СССР : в 30 т. / гл. ред. В. Л. Комаров. — М.—Л.: Изд-во АН СССР, 1945. — Т. XI / ред. тома Б. К. Шишкин. — С. 148—150.

35. Хижняк, С.В. Микрофлора пещер окрестностей г. Красноярска / С.В. Хижняк, И.В. Таушева, И.Н. Маячих // Вестник КрасГАУ. – 1999. – Вып. 5. – С.80–84.

36. Хижняк, С.В. Численность и качественный состав микрофлоры карстовых пещер Красноярского края / С.В. Хижняк, И.В. Таушева, А.А. Березикова, Е.В. Нестеренко // Проблемы экологии Сибири: Сб. науч. трудов. – Красноярск, 2001. – С. 69–77.

37. Хижняк, С.В. Естественная микрофлора пещер Красноярского края / С.В. Хижняк, И.В. Таушева, А.А. Березикова, Ю.Д. Рогозин, Е.В. Нестеренко // Проблемы экологии и охраны пещер: мат-лы 1-й Общероссийской науч.– практ. конф. "Проблемы экологии и охраны пещер: теоретические и прикладные аспекты": Сб. науч. тр. – Красноярск, 2002. – С.48–56.

38. Хижняк, С.В. Некоторые биологические особенности бактерий, выделенных в пещерах Красноярского края / С.В. Хижняк, А.А. Березикова, И.В. Таушева // Вестник КрасГАУ. – 2002. – Вып. 8. – С. 132–135.

39. Хижняк, С.В. Психрофильные и психротолерантные гетеротрофные микроорганизмы карстовых полостей Средней Сибири / С.В. Хижняк, И.В. Таушева, А.А. Березикова, Е.В. Нестеренко, Д.Ю. Рогозин // Экология. – 2003. – № 4. – С.261–266.

40. Хижняк, С.В. Психрофильные и психротолерантные гетеротрофные микроорганизмы карстовых полостей Средней Сибири / С.В. Хижняк, И.В. Таушева, А.А. Березикова и др. // Экология. – 2003. № 4. – С.261–266.

41. Хижняк, С.В. Оценка эффективности психрофильных пещерных микроорганизмов в биологической борьбе с обыкновенной корневой гнилью зерновых / С.В. Хижняк, Е.П. Ланкина, И.Р. Илиенц // Вестник Красноярского государственного аграрного университета. – 2009 – № 6. – С. 49–52.

42. Хижняк, С.В. Связь между уровнем антропогенной нагрузки и антибиотической активностью пещерной микробиоты / С.В. Хижняк, И.Р. Илиенц, Е.П. Ланкина // Вестник КрасГАУ. – 2009 – № 7. – С. 52–55.
43. Хижняк, С.В. Микробные сообщества карстовых пещер Средней Сибири: автореферат дисс. докт. биол. наук / С.В. Хижняк. – Красноярск, 2009. – 32 с.
44. Хижняк, С.В. Автохтонная и аллохтонная микробиота карстовых пещер и подземных водоемов Средней Сибири / С.В. Хижняк, Е.В. Нестеренко, Е.П. Ланкина, И.Р. Илиенц, С.В. Овсянкина (Воробьева), А.А. Кимм, А.И. Воронов // 3-ий байкальский микробиологический симпозиум с международным участием «Микроорганизмы и вирусы в водных экосистемах», 2011. – С. 139-140.
45. Хижняк, С.В. Карстовые пещеры как источник психрофильных штаммов для ферментативной переработки сырья зерноперерабатывающей и плодоовощной отрасли и повышения пищевой биологической ценности продукции / С.В.Хижняк, И.Р. Илиенц, Л.П. Рубчевская и др. // Вестник КрасГАУ, 2012. – Вып. 5. – С.411-415.
46. Цыкин, Р.А. Пещеры Красноярского края./ Р.А. Цыкин, и др. – Красноярск: Красноярское книжное изд-во, 1974.–104 с.
47. Цыкин, Р.А. Отложения и полезные ископаемые карста./ Р.А. Цыкин. – Новосибирск: Наука, 1985. – 267 с.
48. Щеглов, В.Д. Дивья пещера / В.Д. Щеглов, Ю.А. Колясников // Пещеры. – Пермь, 1964. – Вып. 4 (5). – С. 5-19.
49. D,Aoust, J.Y. *Vibrio psychroerythrus* sp. n.: Classification of the Psychrophilic Marine Bacterium, NRC 1004 / J.Y. D,Aoust, D.J. Kushner // J. of Bacteriology. – 1972. – P. 340–342.
50. Druce R.G. An ecological study of psychrotrophic bacteria of soil, water, grass and hay / R.G. Druce, S.B. Thomas // J. Appl. Bacterial. – 1970. – №33 – P. 420–435.

51. Ganzert, L. *Arthrobacter livingstonensis* sp. nov. and *Arthrobacter cryotolerans* sp. nov., salt-tolerant and psychrotolerant species from Antarctic soil / L. Ganzert, F. Bajerski, K. Mangelsdorf et al. // *Int J Syst Evol Microbiol.* – 2011. – 61(Pt 4). – P. 979–984.
52. Jackson, H. Loss of viability and metabolic injury of *Staphylococcus aureus* resulting from storage at 5°C / H. Jackson // *J. Appl. Bacteriol.* – 1974. – № 37. – P. 59–64.
53. Khizhnuak S.V. Ecological and biological peculiarities of microorganisms from underground karst cavities of the Middle Siberia / S.V. Khizhnuak, I.V. Tausheva, A.A. Berezikova, E.V. Nesterenko // *Homeostasis of forest ecosystems: Proc. X International Symposium "Concept of Homeostasis: Theory, Experiments and Application"*. – Novosibirsk. – 2001. – P. 161–165.
54. Khizhnuak S. Supposed contribution of cave microorganisms to a karstic process in the limestone caves of Eastern Siberia / S. Khizhnuak, I. Tausheva, A. Berezikova // *Contributions to the IGCP448 meeting in Bowling Green, Ky, USA, June 3–6 2003, Part III–1 World comparison of karst ecosystem.* – Bowling Green. – 2003. – P. 99.
55. Khizhnyak S.V. The microbial communities of Middle Siberian cold caves / S.V. Khizhnyak, E.V. Nesterenko, A.A. Berezikova, I.V. Trusey // *3-rd International Workshop on Ice Caves: Volume of Abstracts. Kungur Ice Cave, Perm Region Russia, May 12–17.* – Kungur. – 2008. – P. 56–57.
56. Kulpa, C.F. Properties of psychrophilic bacteriophage specific for *Micrococcus cryophilus* / C.F. Kulpa, R. H. Olsen // *Canadian Journal of Microbiology.* – 1971. – 17: (2) – P. 157–160.
57. Margesin, R. Cold-loving microbes, plants, and animals-fundamental and applied aspects / R. Margesin, G. Neuner, K. B. Storey // *Naturwissenschaften*. – 2007. – № 94 – P. 77 – 99.
58. Morita, R.Y. Marine psychrophilic bacteria / R.Y. Morita // *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* – 1966. – №4. – P. 105–121.

59. Morita, R.Y. Psychrophilic bacteria / R.Y. Morita // *Bacteriol. Rev.* 1975. Vol. 39. – P. 144–167.
60. Nam, E. S. Isolation and Characterization of Cold-adapted bacteria Producing Lactose hydrolyzing enzyme isolated from soils of Nome area in Alaska / E. S. Nam, J. K. Ahn // *International Research Journal of Microbiology.* – 2011. – Vol. 2(9). – P. 348-355.
61. Rodrigues, D. F. Coping with our cold planet /D. F. Rodrigues, J. M. Tiedje // *Applied and Environmental Microbiology.* – 2008. – Vol. 74. – №6. – P. 1677–1686.
62. Russell, N. J. Molecular adaptations in psychrophilic Bacteria: potential for biotechnological applications. / N. J. Russell // *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology* 61. – 1998. – P. 1–21.
63. Sánchez, L.A., Gómez, F.F. and Delgado, O.D. Extremophiles (2009) 13: 111. doi:10.1007/s00792-008-0203-5
64. Verma, M. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. / M. Verma, Satinder K. Brar, R.D. Tyagi, R.Y. Surampalli, J.R. Val'ero // *Biochemical Engineering Journal.* - 2007. — V.37. - P. 1-20.
65. Xu, M. *Flavobacterium sinopsychrotolerans* sp. nov., isolated from a glacier / Y. Xin, J.Tian, K. Dong et. al. // *Int J Syst Evol Microbiol.* – 2011. – 61(1). – P. 20-24.
66. Zhang, D.C. *Arthrobacter alpinus* sp. nov., a psychrophilic bacterium isolated from alpine soil / D.C. Zhang, P. Schumann, H.C. Liu et al. // *Int J Syst Evol Microbiol.* – 2010. – 60(9). – P. 2149-2153.

ПРИЛОЖЕНИЕ А



Рисунок 1 – Гистограмма распределения проростков люцерны варианта контроль (второй эксперимент) по длинам корней, см

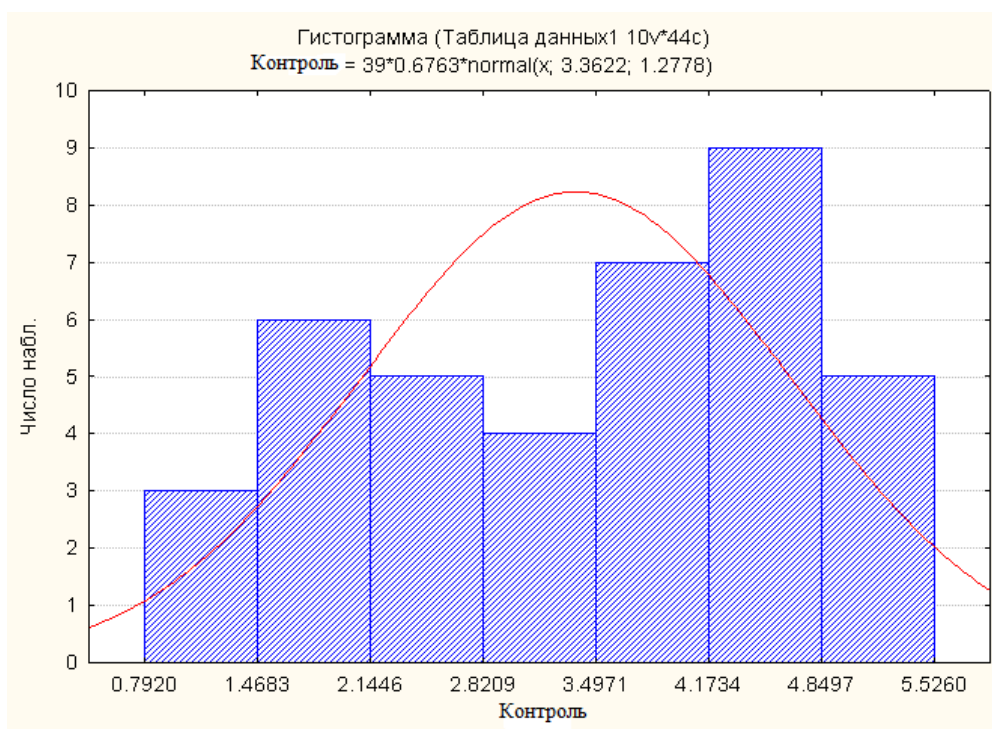


Рисунок 2 - Гистограмма распределения проростков люцерны варианта контроль (третий эксперимент) по длинам корней, см

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

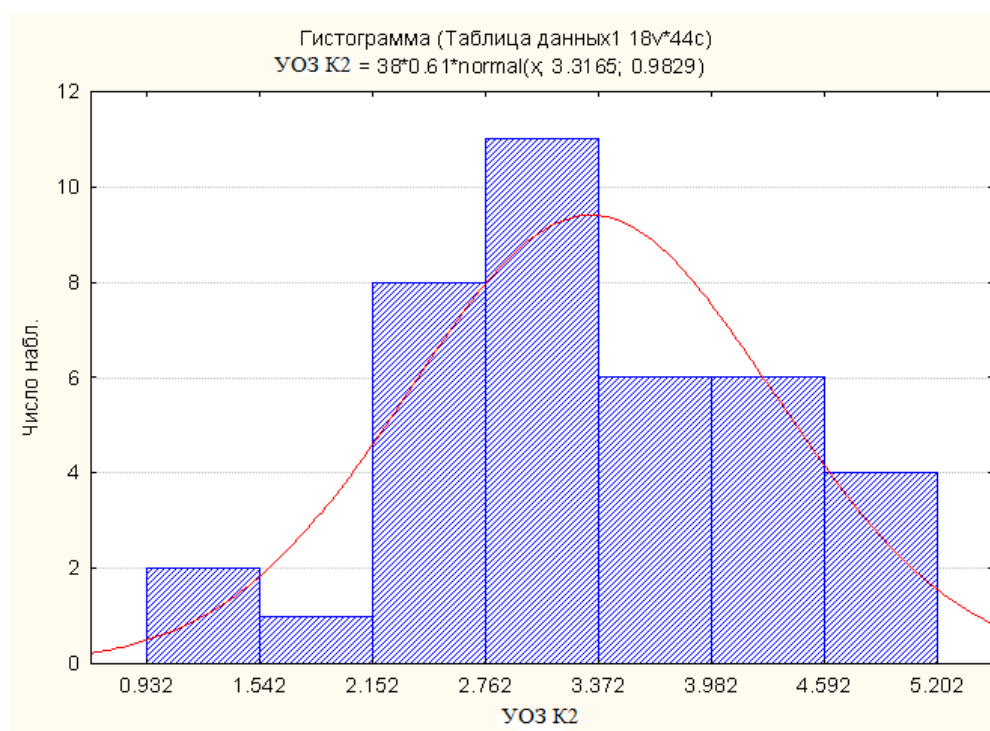


Рисунок 3 - Гистограмма распределения проростков люцерны варианта УОЗK2 (второй эксперимент) по длинам корней, см

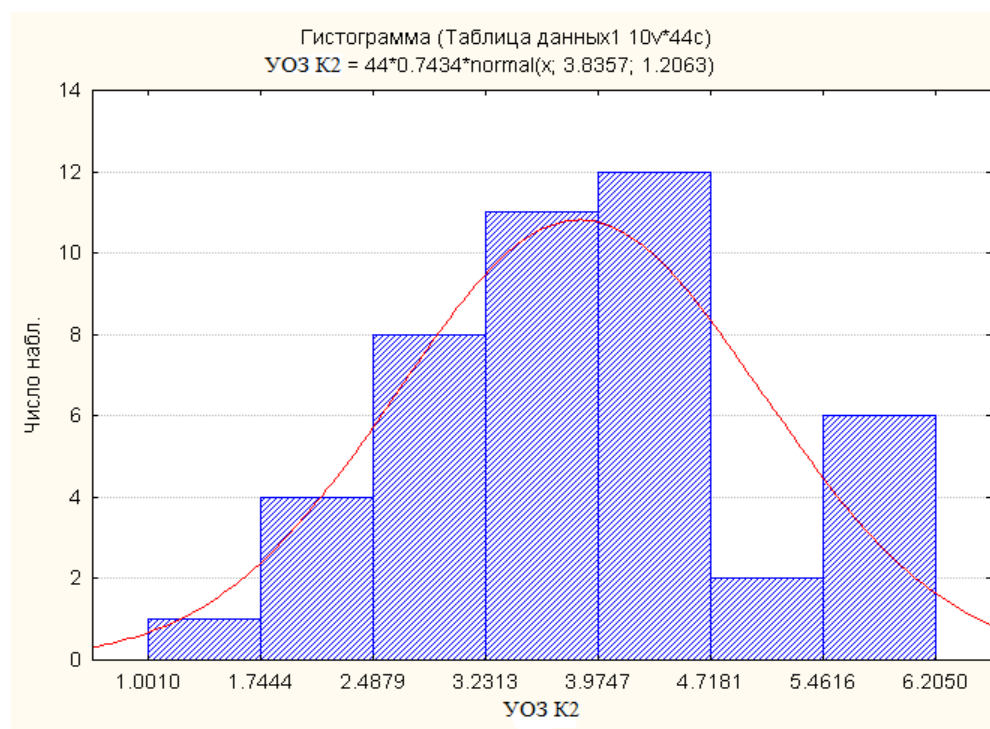


Рисунок 4 – Гистограмма распределения проростков люцерны варианта УОЗK2 (третий эксперимент) по длинам корней, см

ПРИЛОЖЕНИЕ В

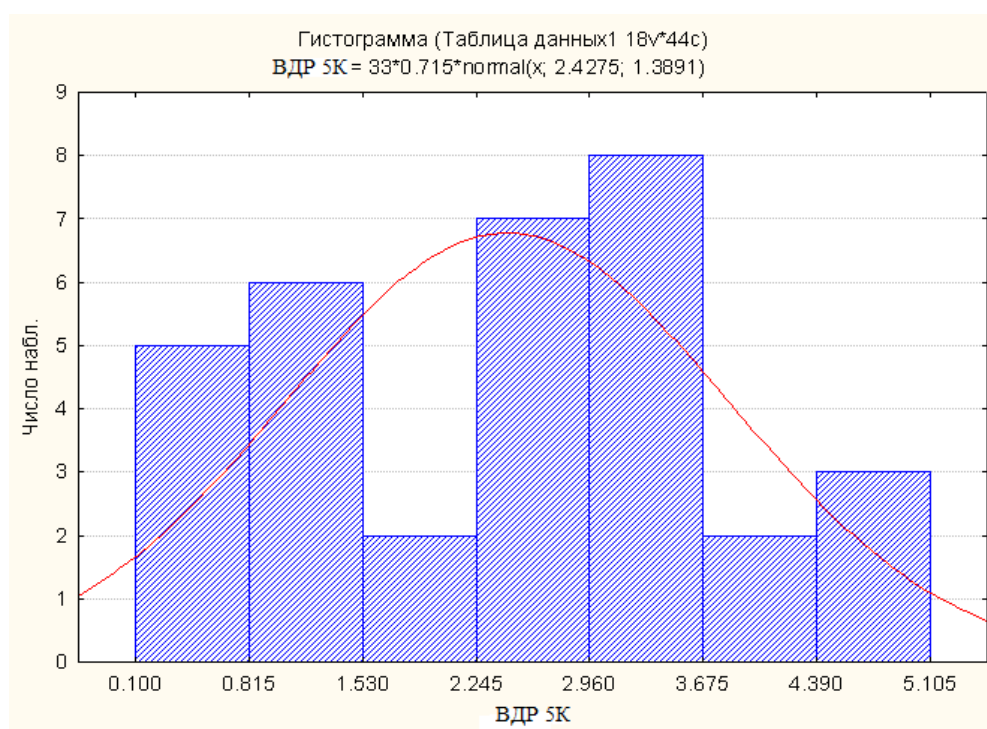


Рисунок 5 - Гистограмма распределения проростков люцерны варианта ВДР5К (второй эксперимент) по длинам корней, см

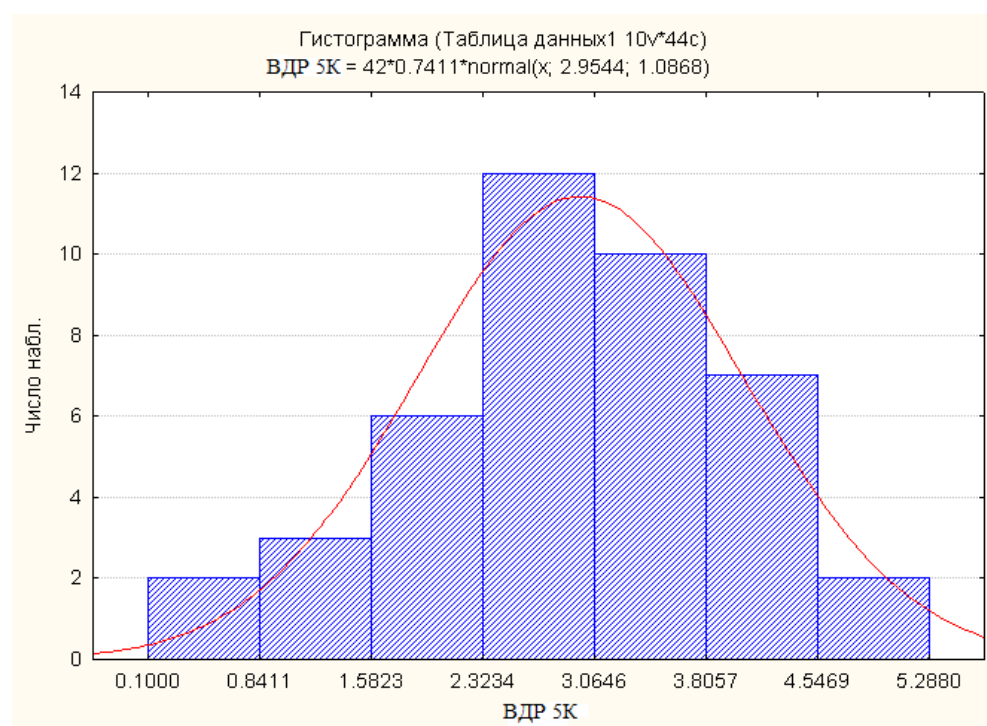


Рисунок 6 – Гистограмма распределения проростков люцерны варианта ВДР5К (третий эксперимент) по длинам корней, см

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

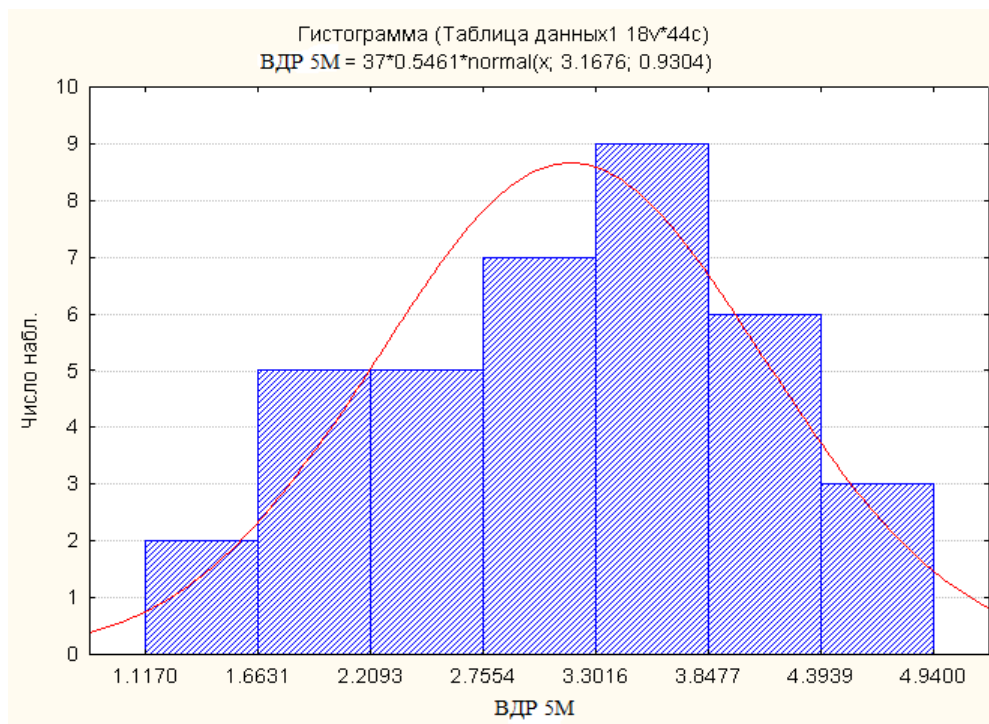


Рисунок 7 - Гистограмма распределения проростков люцерны варианта ВДР5М (второй эксперимент) по длинам корней, см

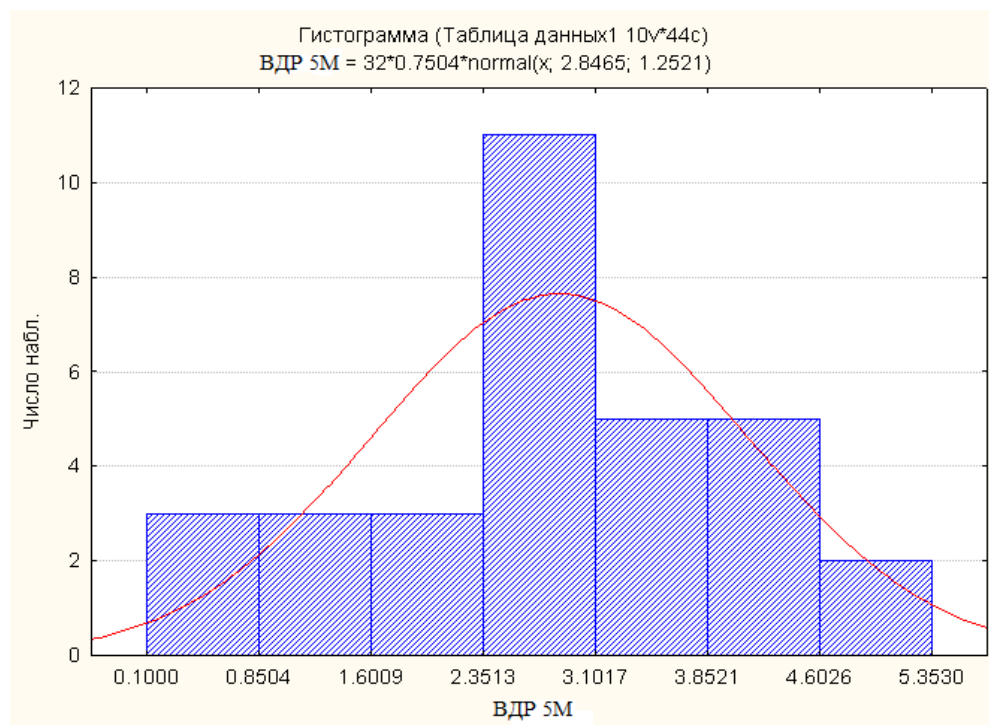


Рисунок 8 - Гистограмма распределения проростков люцерны варианта ВДР5М (третий эксперимент) по длинам корней, см